



5
2ef

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



V. N. A. M.

**"PRESENTACION FARMACEUTICA DE EXTRACTO
TIROIDEO DE BOVINO OBTENIDO EN LA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
AQUILES BECERRA MENDOZA

FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS:

Q. F. B. María Esther Revuelta Miranda

COASESOR DE TESIS:

Q. F. B. Efrén Hernández Baltazar

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	Pag.
TITULO	1
RESUMEN	
I. OBJETIVOS	2
II. INTRODUCCION	3
1). ASPECTOS GENERALES DE LA TIROIDES	3
a). LOCALIZACION Y ANATOMIA	3
b). FISIOLOGIA Y BIOQUIMICA	6
2). EXTRACTO TIROIDEDO	14
a). DEFINICION	14
b). ASPECTOS GENERALES	14
c). METODOS DE OBTENCION	16
3). PRESENTACIONES FARMACEUTICAS	21
a). GENERALIDADES	21
b). TIPOS DE PRESENTACIONES FARMACEUTICAS MAS ADECUADAS PARA EL EXTRACTO TIROIDEDO	22
III. MATERIALES Y METODOS	28

1).	OBTENCION DEL EXTRACTO TIROIDEO	28
2).	PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE LAS HORMONAS T ₃ Y T ₄ EN EL EXTRACTO TIROIDEO	31
3).	PREPARACION DE LA SUSPENSION	33
4).	PRUEBAS DE EFECTIVIDAD BIOLOGICA DE LA SUSPENSION	37
IV.	OBSERVACIONES Y RESULTADOS	37
1).	APARIENCIA DEL EXTRACTO	37
2).	APARIENCIA DE LA SUSPENSION	37
3).	COMPORTAMIENTO DE LAS RATAS DURANTE EL PROYECTO	38
4).	TABLAS Y GRAFICAS DE RESULTADOS	40
	TABLA 1	40
	FIGURA 1,1	41
	FIGURA 1,2	42
	FIGURA 1,3	43

TABLA 2	44
FIGURA 2,1	45
TABLA 3	46
FIGURA 3,1	47
FIGURA 3,2	48
FIGURA 3,3	49
TABLA 4	50
FIGURA 4,1	51
ANALISIS DE VARIANZA	52
V. DISCUSION	61
VI. CONCLUSIONES	66
VII. REFERENCIAS	68

**PRESENTACION FARMACEUTICA DE EXTRACTO TIROIDEO
DE BOVINO OBTENIDO EN LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN.**

RESUMEN

La glándula Tiroides tiene como función principal, la de producir y secretar compuestos metabólicamente activos llamados hormonas, que son los responsables de regular diversas funciones metabólicas.

Estas hormonas son la Trivodotironina y la Tiroxina, como los principales productos de secreción de la glándula tiroides. La deficiencia de estas hormonas puede producir enfermedades que se pueden controlar por medio de tratamientos con hormonas tiroideas (en este caso, la enfermedad se llama hipotiroidismo). En el caso de una producción excesiva de hormonas, esta se puede controlar con productos químicos para inhibir este exceso de hormonas (en este último caso la enfermedad se llama hipertiroidismo).

Este proyecto está enfocado a la elaboración de un extracto en polvo de glándula tiroides y la subsecuente preparación de una formulación farmacéutica usando como principio activo, de dicha formulación, el extracto tiroideo.

En este proyecto se usaron ratas para probar el extracto como principio activo en la formulación farmacéutica, y se compararon los efectos obtenidos con los efectos que produce una formulación comercial, y ambos productos farmacéuticos fueron administrados por vía oral.

1. OBJETIVOS

GENERAL:

Diseñar la mejor presentación farmacéutica a un extracto tiroideo de bovino obtenido en la FES-C reuniendo los requerimientos de aspecto, calidad y manejo para su uso.

PARTICULARES:

a) Obtener un extracto crudo de tiroides de bovino según la metodología indicada. (4)

b) Procesar el extracto con la finalidad de darle una presentación farmacéutica para que tenga aspecto y calidad adecuados. Así como que dicha presentación nos permita manejarlo en el laboratorio fácilmente al dosificarlo a ratas.

c) Obtener el producto para su uso en el laboratorio de Bioquímica de Sistemas, y otros que lo requieran.

11. INTRODUCCION

1). Aspectos Generales de la Tiroides

a). Localización y Anatomía

Una de las glándulas endócrinas más grandes es la tiroides. Existe en todos los vertebrados. La tiroides de un humano adulto pesa de 20 a 30 g. Está situada en el cuello, abrazando el extremo superior de la tráquea y la porción inferior de la laringe. Formada por lóbulos laterales, uno a cada lado, con un istmo que los conecta. En algunas especies, hay un lóbulo piramidal medio, localizado al frente de la laringe. La glándula tiroides tiene una capsula de tejido conectivo fibroso de la fascia cervical profunda. Las traveculas penetran desde la capsula hacia el tejido glandular, subdividiéndolo en lobulillos y portando vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Las subdivisiones más finas del estroma tiroideo son de tejido conectivo fibroso laxo y reticular que dan apoyo a un rico lecho capilar. (25)

El parénquima tiroideo está formado por folículos epiteliales y unas células interfoliculares. Los folículos (ó células foliculares) varían en tamaño, desde pequeños grupos de células casi sin luz, hasta estructuras globulares de 100 a 200 micrómetros de diámetro. El epitelio folicular humano adulto bajo condiciones normales es cúbico, pero la altura de la células

varia con la actividad glandular; las células son escamosas durante la hipoactividad y columnares altas cuando la glándula es hiperactiva. (25)

En el bovino la glándula tiroides está formada por dos lóbulos triangulares, aplanados, conectados por un istmo triangular que cruza la superficie ventral de la tráquea, al nivel del primer o segundo anillo. El color es más pálido en el adulto y rojo oscuro en la ternera. Cada lóbulo mide aproximadamente 8 cm de longitud, 5 cm de alto y pesa unos 115 g. La glándula contacta con la superficie lateral del cartilago cricoides. El borde dorsal de la glándula asienta sobre el esófago, y el craneal es más bien recto en su contorno y se relaciona con los músculos cricofaríngeo, cricoaritenoides y con la arteria tiroaríngea. El borde caudoventral, cóncavo, contacta con la tráquea y la superficie lateral de la glándula está relacionada con los músculos esternotiroideo y esternocefálico, con la arteria carótida, la vena yugular interna, el vago y los nervios simpáticos. (20)

El aporte arterial deriva, fundamentalmente, de la rama tiroidea, procedente de la tiroaríngea, que se divide al alcanzar esta glándula. Una rama superficial cursa hacia abajo, a lo largo del borde craneal y, ocasionalmente, desaparece en la unión del lóbulo y el istmo. Una rama profunda grande cursa hasta la superficie del lóbulo y también envía ramas al esófago. La

arteria tiroidea caudal, en caso de que esté presente, entra en el lóbulo por el ángulo caudal. (20)

La tiroides está compuesta por gran número de folículos cerrados (de 150 a 300 micras de diámetro) llenos de una sustancia secretoria llamada coloide, y revestidos de células epiteloideas cuboideas que secretan hacia el interior de los folículos. (8)

Las células foliculares son células glandulares típicas que secretan proteínas tales como: tiroglobulina, enzimas de biosíntesis de T_3 y T_4 , y otras sustancias necesarias para la síntesis de la hormona tiroidea, también captan yodo. El retículo endoplásmico y el complejo de golgi sintetizan y secretan una molécula grande de glicoproteína llamada tiroglobulina, con peso molecular de 660,000 D. Secretándose al espacio coloidal, constituyendo el principal componente del coloide. Cada molécula de tiroglobulina contiene alrededor de 5000 aminoácidos dispuestos en cuatro cadenas polipeptídicas ó subunidades, de los cuales 114-140 corresponden a tirosina ó tirosilos, estos últimos constituyen el sustrato principal que se combina con el yodo para formar las hormonas tiroideas. Estas hormonas se forman dentro de la molécula de tiroglobulina. O sea que los residuos de aminoácidos de tirosina siguen constituyendo parte de la molécula de tiroglobulina durante todo el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas se producen por tanto en la región coloidal, sobre la molécula de

tiroglobulina; esta penetra al interior de la célula folicular por endocitosis como parte de una vesícula. En el citoplasma se fusionan lisosomas y vesículas endocíticas, degradándose la tiroglobulina se obtienen aminoácidos y hormonas tiroideas (T_2 y T_4). Estas hormonas difunden a circulación en donde interactúan con proteínas plasmáticas específicas: Albúmina, Prealbúmina y Globulina fijadora de tiroxina. (4,8,12)

b). Fisiología y Bioquímica

La glándula tiroides desempeña como función principal la producción y secreción de compuestos metabólicamente activos u hormonas que son esenciales para la regulación de diversas funciones metabólicas. Las hormonas tiroideas son producidas en el interior de las células de los folículos a partir de proteínas, del aminoácido tirosina y del elemento halógeno yodo. Las dos hormonas tiroideas más importantes son la tiroxina (T_4 , levotiroxina), la cual contiene 4 átomos de yodo, y la triyodotironina (T_3 , liotironina), que posee 3 átomos de yodo. Las hormonas tiroideas son liberadas del coloide y segregadas en la circulación en respuesta a estímulos de la glándula tiroides como consecuencia de la acción adenohipofisiaria denominada tiroideo-estimulante (TSH). La más abundante de las hormonas que produce la tiroides es la tiroxina. Sin embargo, también se producen cantidades de triyodotironina. La función de las dos hormonas es cualitativamente la misma, pero difieren en la

rapidez e intensidad de acción. La triyodotironina es unas cuatro veces más potente que la tiroxina, pero se halla en la sangre en cantidades mucho menores, y persiste mucho menos tiempo que la tiroxina. (7,8,12)

La glándula tiroides secreta dos hormonas importantes, la tiroxina y la triyodotironina, que ejercen un efecto profundo en el índice metabólico del organismo. Esta glándula secreta asimismo calcitonina, hormona importante para el metabolismo del calcio. La falta total de secreción tiroidea hace que el índice metabólico basal descienda a aproximadamente el 40% por debajo de lo normal, su producción excesiva lo aumenta hasta en un 60 a 100 % sobre lo normal. La secreción tiroidea depende de la producción de tirotropina (TSH), secretada por la hipófisis anterior. (8,25)

El efecto principal de la tiroxina es aumentar las actividades metabólicas de la mayor parte de los tejidos corporales (con unas pocas excepciones notables, como el cerebro, retina, bazo, testículo y pulmones). El metabolismo basal puede aumentar hasta 60 ó 100 % cuando la secreción de hormonas es elevada. Se acelera considerablemente la transformación de los alimentos en energía. La síntesis de proteínas aumenta a veces, otras veces lo que aumenta es la catabolita proteinica. (8)

Para conservar un metabolismo basal normal, debe secretarse constantemente la cantidad exactamente necesaria de hormona

tiroidea; para ello disponemos de un mecanismo de retroalimentación específico, en el que intervienen el hipotálamo y la hipófisis anterior para controlar la secreción tiroidea según las necesidades metabólicas del organismo. La hormona estimulante de la tiroides (TSH), llamada también tirotropina, es una hormona adenohipofisiaria, una glucoproteína de peso molecular aproximadamente de 28000 D. Aumenta la secreción de tiroxina y triyodotironina por la glándula tiroides. (8)

La función metabólica general de las hormonas tiroideas es incrementar el consumo de oxígeno. Este efecto es observado en todos los órganos excepto en el cerebro, el sistema retículo endotelial y las gónadas. Las hormonas tiroideas inducen a la alfa-glicerolfosfato deshidrogenasa mitocondrial y esto puede relacionarse a los efectos sobre el consumo de oxígeno. (16)

Las cantidades insuficientes de T_4 y T_3 libres conducen al trastorno clínico conocido como hipotiroidismo. Este por lo general, se debe a una falla de la tiroides, pero puede ser causado por patología de la hipófisis, del hipotálamo y por deficiencia de Iodo. En el hipotiroidismo, el índice del metabolismo basal es bajo, así como los demás procesos dependientes de las hormonas tiroideas. Las características importantes son: frecuencia cardíaca lenta, hipertensión diastolítica, comportamiento abúlico (disminución notable de energía), somnolencia, estreñimiento, sensibilidad al frío, piel y cabellos secos, y aspecto cretino. El hipotiroidismo al final

de la niñez se manifiesta con estatura corta pero sin retraso mental. Las diversas clases de hipotiroidismo son tratadas por restitución con hormona tiroidea exógena. (16)

En muchos casos el hipotiroidismo depende probablemente de autoinmunidad contra la glándula tiroides, una inmunidad que la destruye. Las glándulas tiroides de la mayoría de los pacientes presentan primero "tiroiditis", que significa inflamación de la tiroides. Ello causa el deterioro progresivo y por último fibrosis de la glándula, con la consiguiente disminución o ausencia de secreción de hormona tiroidea. Sin embargo, también hay varios tipos de hipotiroidismo, que suelen acompañarse del crecimiento de la glándula tiroides, llamado bocio tiroideo. La palabra "bocio" significa glándula tiroides muy aumentada de tamaño. (8)

El tratamiento del hipotiroidismo consiste en la administración oral de hormona tiroidea de reemplazo, la cual revierte los hallazgos de laboratorio y los signos y síntomas clínicos, siempre que no existan anormalidades del transporte y en lo que respecta a la utilización periférica de las hormonas tiroideas. (12)

Poco tiempo después de la administración de tiroxina, se produce una síntesis de alfa-glicerofosfato mitocondrial, en todos aquellos órganos, que se sabe, responden a la hormona con un aumento del consumo de oxígeno. Este estímulo sobre la

síntesis de una enzima se refleja en la capacidad de las hormonas tiroideas yodadas, tanto *in vivo* como *in vitro*, de estimular la síntesis proteínica en las mitocondrias y microsomas del hígado. Mediante estudios *in vitro* se ha visto que el efecto hormonal acelera la transferencia de aminocil-tRNA a proteína microsómica. Sin embargo, en vista de la amplia acción estimulante de la tiroxina o de la triyodotironina sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, no es posible designar macromoléculas específicas cuya síntesis pueda ser la base principal de la acción hormonal. (24)

La hipofunción tiroidea, bien sea experimental o clínica, se refleja en una lentitud acentuada de los procesos corporales, por ejemplo, la velocidad metabólica basal y la temperatura del cuerpo están por debajo de su nivel normal. Si el hipotiroidismo se presenta en el nacimiento, resulta el mixedema infantil o cretinismo. En los adultos se utiliza la palabra mixedema para describir el estado hipotiroideo. (24)

El hipertiroidismo o tirotoxicosis, se debe a la producción excesiva de hormona tiroidea. Hay muchas causas, pero casi todos los casos se deben a la enfermedad de Graves, ocasionada por la producción de IgG estimulante de la tiroides (TSI) que activa al receptor de la TSH. La consecuencia es un crecimiento difuso de la tiroides y la producción incontrolable de T_3 y T_4 , dado que la producción de TSI no está bajo control por retroacción. Los hallazgos son multisistémicos e incluyen frecuencia cardíaca

acelerada, presión ampliada del pulso, nerviosismo, insomnio, pérdida de peso a pesar del apetito voraz, debilidad, diaforesis excesiva, sensibilidad al calor y piel húmeda y enrojecida. Esta observación dirigió el interés hacia las mitocondrias, donde se demostró que T_4 produce cambios morfológicos y desacopla la fosforilación oxidativa. Estos efectos observados requieren cantidades masivas de T_4 y es casi seguro que no sean fenómenos fisiológicos. El hipertiroidismo de la enfermedad de Graves es tratado bloqueando la producción de hormona con un agente antitiroideos, por ablación (extirpación del órgano o parte de él) de la glándula con un isótopo radiactivo del I (como I^{131}) ó por una combinación de estos dos métodos. En ocasiones la glándula se extirpa quirúrgicamente. (16,24)

Las alteraciones funcionales de la tiroides pueden provocar trastornos oculares y afectar la función visual. Las enfermedades tiroideas pueden causar exoftalmos (protusión de los ojos), y éste producir molestia por irritación conjuntival o corneal. (18)

Parece claro que la tiroglobulina suele pasar a la sangre, así como el coloide. La concentración normal de tiroglobulina en el suero es de 6 ng/ml y esta concentración aumenta en el hipertiroidismo y en algunas formas de cáncer de la tiroides. Sin embargo, no se sabe si la tiroglobulina circulante tiene alguna función. (7)

Debido a que la triyodotironina (T_3) actúa mucho más rápidamente que la tiroxina y es de 3-5 veces más potente sobre una base molar, se ha propuesto que la T_4 es mucho menos activa que la triyodotironina. Evidencia adicional a favor de este punto de vista es el hecho de que la triyodotironina se une a los receptores en el núcleo en mucho mayor grado que la tiroxina. Es difícil probar que la tiroxina no tenga su propia actividad metabólica, pero ciertamente se califica como una prohormona en el sentido de que es el mayor precursor de la triyodotironina.

(7)

Debe hacerse notar que una parte importante de la T_3 en la hipófisis anterior y en el cerebro, se forma intracelularmente a partir de T_4 . Por consiguiente, el efecto de retroacción de las hormonas tiroideas sobre la hipófisis anterior para inhibir la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) es debido principalmente a la T_4 circulante más que la T_3 . (7)

Las principales hormonas secretadas por la tiroides son la tiroxina (T_4) y la triyodotironina (T_3). La triyodotironina también es formada en los tejidos periféricos por desyodación de la tiroxina. Ambas derivan de aminoácidos yodados, específicamente de tirosina. Pequeñas cantidades de triyodotironina inversa (3,3',5'-triyodotironina, T_3I o RT_3), de diyodotirosina, monoyodotirosina y de otros compuestos, también se encuentran en la sangre venosa de la tiroides. La triyodotironina es más activa que la tiroxina en tanto que la

triyodotironina inversa (T_3I) no es activa. Las formas de tiroxina que ocurren naturalmente y sus congéneres con un átomo asimétrico de carbono son los isómeros L. La D-tiroxina solo tiene una pequeña fracción de la actividad de la forma L. (7)

La función tiroidea esta controlada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH) de la hipófisis anterior. La secreción de esta hormona trópica, a su vez, es regulada en parte por retroacción inhibitoria de los niveles altos de hormona tiroidea circulante, la secreción de esta hormona está bajo control hipotalámico (factor liberador de la tirotropina ó TRH). La tasa de secreción tiroidea depende por tanto de TRH, TSH, factores intrínsecos de la glándula tiroides y yoduros de la dieta. (33)

Dada la importancia de las hormonas que produce esta glándula y de los cuadros clínicos en que se involucran, nos interesa elaborar un producto farmacéutico cuyo principio activo sea extracto tiroideo.

2). Extracto Tiroideo

a). Definición

El extracto es una forma farmacéutica líquida, semisólida, o sólida y polvorienta, preparada con soluciones extractivas, obtenidas por agotamiento de fármacos vegetales o animales con disolventes apropiados, que luego se evaporan parcial o totalmente, ajustando el residuo a tipos determinados para cada fármaco. (9)

El extracto tiroideo es un producto homogéneo, sólido, que se obtiene a partir de la glándula tiroides (y en particular para este proyecto) de bovino.

b). Aspectos Generales

Los extractos se obtienen concentrando hasta determinado grado, los extractos líquidos procedentes de fármacos frescos o secos, vegetales o animales y diluyéndolos después con un solvente apropiado como agua, alcohol o éter. (5)

La preparación de un extracto comprende 2 operaciones sucesivas: La extracción de los principios activos del fármaco, con menstruos adecuados y su concentración posterior. (5)

La concentración del extracto líquido se verifica evitando las alteraciones que sufren las materias orgánicas por la acción del calor, sobre todo en contacto del aire. La evaporación no se realiza nunca sobre fuego directo. Los mejores procedimientos son aquellos en los que se emplea la temperatura más baja para evaporar el líquido, en el menor tiempo posible. En principio, se aplica una temperatura inferior a 50°C, bajo presión reducida. Cuando se procede por nebulización, la temperatura utilizada es más elevada, ya que así se elimina el solvente por medio de una corriente de gas caliente, que lo divide en gotas finísimas, produciendo una evaporación casi instantánea. (5,6)

De acuerdo con su consistencia, los extractos son de cuatro clases:

1.- Extractos líquidos llamados fluidos que se preparan generalmente, por extracción de los principios activos de los fármacos con dos percolaciones sucesivas y concentrando el segundo extracto líquido que se agrega al primero, para obtener un extracto cuyo peso corresponda exactamente al peso del fármaco empleado.

2.- Extractos blandos de consistencia similar a la miel espesa.

3.- Extractos firmes de consistencia pilular.

4.- Extractos secos casi anhidros, que con frecuencia son higroscópicos. Se pueden obtener por nebulización y en general se pulverizan fácilmente. (5)

c). Métodos de Obtención

Los extractos de tejidos animales conteniendo principios biológicamente activos pueden prepararse en forma de líquidos, semisólidos y sólidos secos. (9)

Los fármacos que se emplean para preparar los extractos, se desecan previamente y se dividen en forma adecuada respecto a la naturaleza de la misma, al solvente y al modo de extracción utilizado. Algunos fármacos vegetales se estabilizan antes de la desecación y pulverización que precede a la extracción. La estabilización consiste en la destrucción de las enzimas del fármaco fresco, tratándolo, por ejemplo, con vapor de agua o con alcohol hirviente, durante un tiempo suficiente o por cualquier otro procedimiento que no altere sus principios activos. (5)

Para extraer los principios activos se puede utilizar alguno de los siguientes procedimientos:

Maceración. Es la operación farmacéutica en que se mantiene al fármaco en contacto con un solvente frío.

Digestión. En este procedimiento se mantiene al fármaco en contacto con el solvente, a una temperatura inferior a la de ebullición, pero superior a la temperatura ambiente.

Decocción. Los principios activos solubles del fármaco se extraen por medio de un solvente en ebullición.

Infusión. Consiste en verter sobre el fármaco el solvente, generalmente en ebullición, dejando enfriar posteriormente.

Percolación. Es la operación en la que el solvente, generalmente frío, se pasa lenta y regularmente de arriba a abajo, a través del fármaco convenientemente dividido y dispuesto en capas suficientemente gruesas, en un percolador. Con este procedimiento, se realiza la extracción más completa, con el mínimo del solvente. Para evitar alteraciones es posible proceder más rápidamente utilizando un mayor cantidad de solvente.

La concentración del extracto líquido se verifica evitando las alteraciones que sufren las materias orgánicas por la acción del calor, sobre todo en contacto del aire. La evaporación no se realiza nunca sobre fuego directo. Los mejores procedimientos son aquellos en los que se emplea la temperatura más baja para evaporar el líquido, en el menor tiempo posible. En principio, se aplica una temperatura inferior a 50°C, bajo presión reducida. (5, 51, 52, 53)

Para la elaboración del extracto obtenido en el laboratorio de la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES - CUAUTITLAN (FES-C), se usará el procedimiento básico de percolación que explica la FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS (FNEUM) (5),

y con referencia al extracto utilizado en una tesis de licenciatura (4) realizada en la FES-C.

- La clase del extracto según la FNEUM es la número 4 (extractos secos casi anhidros...). Así el extracto obtenido es un polvo seco casi anhidro, que además tiene la capacidad de absorber agua del medio. Este extracto en polvo es en sí, el principio activo que se usará para preparar la forma farmacéutica. La forma farmacéutica fundamental polvo se obtiene por división mecánica de los fármacos al estado sólido, y se puede definir como: La dispersión homogénea de partículas sólidas discretas, provenientes de materiales relativamente secos y que tienen una dimensión máxima de menos de 1000 micrómetros. (14)

La importancia de los polvos radica en lo múltiple de sus usos y aplicaciones, ya sea como tales o integrando otras formas posológicas sólidas, estas se derivan tanto por fraccionamiento (cápsulas como por compactación (gránulos comprimidos, etc.), eventualmente los polvos pueden ingresar como tales a formas líquidas (soluciones, suspensiones) o plásticas (pomadas, supositorios). (14)

Propiedades básicas de los polvos:

Para conocer el comportamiento de los polvos en el proceso de manufactura, es necesario saber las propiedades que le caracterizan como son:

- Estructura cristalina
- Dureza
- Tamaño de partícula y distribución
- Densidad (real y aparente)
- Porosidad intraparticular
- Textura superficial
- Elasticidad y fragilidad

Por lo general, para llegar a un polvo farmacéutico, la secuencia de operaciones es:

- Reducción del tamaño de partícula
- Mezclado
- Tipificación (tamizado)

La reducción de partícula, al tamaño requerido para la manufactura de un producto se obtiene por medio de las siguientes operaciones de mayor a menor: (14)

- | | |
|-------------------|-----------------|
| - Corte o sección | - Trituración |
| - Aserrado | - Molienda |
| - Ruptura | - Pulverización |
| - Aplastamiento | - Micronizado |
| - Fijadura | |

Siendo la más común la secuencia: molienda gruesa, pulverización y micronizado. A estas operaciones siguen otras secundarias o accesorias.

- Clasificación y tipificación (tamizado)
- Ensayos y controles (14)

3). Presentaciones Farmacéuticas

a). Generalidades

Como los fármacos se absorben en estado disuelto, muchas veces se comprueba que el índice de absorción de las formas farmacéuticas orales disminuye en el siguiente orden: solución acuosa > suspensión oral > comprimidos o cápsulas. La biodisponibilidad de un medicamento para ingestión y absorción oral debe ser tal que eventualmente todo el fármaco se absorba en su tránsito por el tracto gastrointestinal, cualquiera que sea la forma farmacéutica. Existen varias razones para formular fármacos en formas en que el fármaco no se halla en estado molecular: a) mejor estabilidad, b) mejor sabor, c) escasa solubilidad en agua, d) apetecibilidad y e) facilidad de administración. Es evidente, entonces, que cada forma farmacéutica tiene sus ventajas y desventajas. (28)

Las formas farmacéuticas en solución, suspensión o emulsión, se pueden preparar, disolviendo el o los componentes activos en un disolvente acuoso o no acuoso, suspendiendo el fármaco (si es insoluble en disolventes farmacéutica o terapéuticamente estables) en un medio apropiado o incorporando el agente medicinal en una de las dos fases de un sistema de aceite y agua. Los fármacos se administran con mayor frecuencia por vía oral mediante formas farmacéuticas sólidas como tabletas y cápsulas. (28)

Los extractos eliminan la necesidad de aislar el fármaco en forma pura, permiten administrar varios componentes de una procedencia única, y permiten emprender el estudio preliminar de fármacos a partir de fuentes naturales. (28)

La preparación de las formas farmacéuticas en las que se pueden hacer formulaciones de algún principio activo requieren varias consideraciones de parte del farmacéutico: finalidad del fármaco, uso interno o externo, concentración del fármaco, elección del vehículo líquido, estabilidad física y química del fármaco, preservación del preparado y uso de excipientes apropiados como buffers, solubilizantes, agentes suspensores, agentes emulsificantes, agentes para controlar la viscosidad, colorantes y saporíferos. (28)

b). Tipos de Presentaciones Farmacéuticas más Adecuadas para el Extracto Tiróideo.

La liotironina es 4 veces más potente en el hombre y 5 veces más potente en la rata que la levotiroxina, pero también existen diferencias en el ritmo de su acción, todo lo que se debe esencialmente al grado de combinación de dichas hormonas con las proteínas sanguíneas acarreadoras. Con la liotironina los efectos metabólicos se observan de 6 a 12 horas, llegando la respuesta máxima a los 2 a 3 días, la que dura 10 a 14 días; mientras que después de una dosis de levotiroxina -vía bucal o intravenosa-,

la acción comienza a los 2 a 3 días, alcanza el máximo a los 10 días, para disminuir luego y desaparecer más o menos al mes. Como actúan en forma lenta y prolongada, la administración diaria produce acumulación. (26)

Las hormonas tiroideas actúan en forma lenta y prolongada, sobre todo la tiroxina, lo que se debe principalmente a su fijación a las proteínas plasmáticas, pero también a su mecanismo de acción, (penetración en el núcleo para actuar sobre la síntesis proteica). Es así que la vida media de la tiroxina es de alrededor de 6.5 días y la de la triyodotironina 1.3 días. Por lo tanto su administración diaria lleva a la acumulación. (26)

La vía de elección es la oral. La vía intravenosa, posible sólo para las hormonas puras, no tiene ventajas sobre aquella, pues el periodo latente es igual cualquiera que sea la vía utilizada. (26)

Por las características físicas del extracto tiroideo, las formas farmacéuticas más apropiadas para su formulación son:

Cápsulas, Comprimidos, Grageas y Suspensiones. Debido a las razones anteriores sería innecesario proponer una formulación para acción sostenida y para la vía parenteral.

Como en el comercio se encuentran preparaciones de polvo de tiroides en forma de cápsulas, y en la farmacopea (5) se reporta

la monografía para el análisis de tabletas de tiroides, se consideró, que no es necesario investigar una formulación para este tipo de presentaciones farmacéuticas porque no se estaría proponiendo una alternativa nueva para el extracto tiroideo. Para el caso de las grageas el procedimiento es el mismo que para los comprimidos, solo que estas llevan una cubierta de azúcar ó entérica. Por estas razones se propuso una formulación para una suspensión del extracto tiroideo.

Esta forma de dosificación líquida es particularmente ventajosa para la administración de medicamentos a niños ó pacientes que no pueden deglutir fácilmente tabletas ó cápsulas. Algunos medicamentos son insolubles en todos los disolventes aceptables, de modo que se deben administrar como comprimidos, cápsulas ó suspensión. La presentación en forma de suspensión puede moderar el sabor desagradable del medicamento. (29,30)

Los pacientes infantiles, geriátricos y con deficiencias mentales, requieren de medicación líquida oral. En general las formas farmacéuticas orales líquidas, ofrecen diversidad en la forma de medicación dada a los pacientes. (29)

La suspensión es la forma posológica ideal para pacientes que tienen problemas para deglutir comprimidos ó capsulas. (28)

Debido al grado de finura de los polvos usados para preparar suspensiones y a las considerables tensiones superficiales de los

sólidos, existe una tendencia a aglomerar sus partículas, destruyendo la suspensión y evolucionando el sistema espontáneamente al estado de mínima energía libre.

Así, las suspensiones son sistemas heterogeneos muy inestables, que consisten de dos fases; una fase externa o continua, que generalmente es un liquido o un semi-sólido y la fase interna o dispersa que consiste de partículas prácticamente insolubles pero capaces de dispersarse en la fase continua, que tienden a unirse aglomerando sus partículas para reducir la superficie de la interfase sólido-liquido.

Una suspensión que en un tiempo determinado presente un volumen de sedimentación mayor que el de otro lote de la misma suspensión en el mismo tiempo, se considera que es más estable. Cuando el valor del volumen de sedimentación es igual a uno, se dice que la suspensión está en equilibrio de floculación. Este volumen puede ser también mayor a uno, este caso y el anterior, son situaciones deseables para una suspensión.

Un primer requisito para la elaboración de una suspensión, es disponer de un polvo homogéneo y asegurarse de que las partículas que lo forman van a estar completamente mojadas por la fase dispersante. Como se sabe, para tener una adecuada humectación, es conveniente que el valor del ángulo de contacto sea mínimo y como, el ángulo de contacto para una interfase sólido-liquido es una función de la tensión interfasial del

líquido, cuando la tensión superficial disminuye también lo hace el ángulo de contacto. Esto indica la conveniencia de utilizar un agente tensoactivo capaz de disminuir la tensión superficial de la fase dispersante y el ángulo de contacto.

Así, debe agregarse el agente tensoactivo, para obtener una suspensión uniforme de partículas separadas individualmente y por lo tanto defloculadas.

Puede agregarse ahora un vehículo estructurado, para tener una suspensión defloculada. La existencia de un elevado potencial Zeta, en la interfase, favorecerá la estabilidad del sistema al haber repulsión entre las partículas; si este vehículo comunica además una elevada viscosidad a la fase dispersante, se retardará la sedimentación, manteniendo entre las partículas una distancia promedio tal, que las fuerzas atractivas sean muy débiles.

Otros factores que pueden retardar la sedimentación son las dimensiones de las partículas y el gradiente de densidad entre las partículas y la fase dispersante. Así, un menor diámetro de partícula y una menor densidad de la fase dispersante, retardarán la sedimentación.

La cuestión fundamental respecto a la obtención de una suspensión adecuada, es poder controlar en el grado suficiente la velocidad de sedimentación, la facilidad de redispersión y poder evitar el apelmazamiento de las partículas sedimentadas a una

masa compacta. La reducción del tamaño de las partículas conduce a una sedimentación más lenta y más uniforme. La granulometría del medicamento determina como factor esencial, la buena presentación del preparado, la velocidad de sedimentación, ausencia de apelmazamiento, velocidad de liberación del medicamento, velocidad de absorción influyendo también sobre la estabilidad del producto. (30)

III. MATERIALES Y METODOS

1. Obtención del Extracto Tiroideo.

El extracto tiroideo se obtuvo mediante el siguiente procedimiento:

a) Se obtuvieron 4 glándulas tiroides de bovinos recién sacrificados en el rastro y se congelaron, y así son cortadas en fracciones de 0.8 a 1.5 mm.

b) Los cortes se suspenden en solución salina fisiológica 0.9% en frío y se guardan a 2°C por 12 hrs.

c) Se elimina el exceso de líquido y el sólido se macera en un mortero y se homogeniza en un virtis (modelo 45 SUPER 30).

d) Luego se filtra a través de una gasa, para eliminar el tejido conjuntivo.

e) Se recolecta el material insoluble por medio de centrifugación a 3000 rpm por 1 hora, utilizando una centrifuga Solbat (modelo J-12).

f) Se le agrega una solución buffer de fosfatos 3.5 Molar, pH = 6.5, hasta el doble del volumen que se obtenga de la centrifugación, agitándose en baño de hielo.

g) Se deja reposar durante 30 minutos y se centrifuga a 3000 rpm por 1 hora.

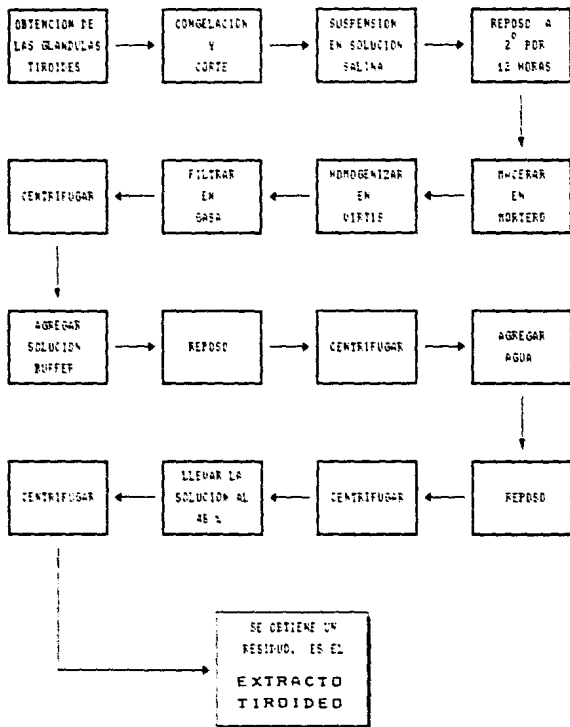
h) Al producto de la centrifugación se le agrega agua suficiente para llevar al fosfato al 43 %.

i) Se deja reposar 30 minutos en hielo y se centrifuga media hora a 3000 rpm. En este paso se elimina el sobrenadante y se usa la pastilla.

j) Nuevamente se lleva la solución al 48 % y se centrifuga a 3000 rpm. De aquí se obtiene un residuo, es el extracto tiroideo.

El residuo se seca en un horno a 60°C por 4 Hrs, para eliminar el exceso de líquido y obtener un polvo. Este polvo se muele en un molino para reducir el tamaño de partícula y homogenizarlo. Se macera en un mortero para finalmente tener un polvo muy fino, que se usará como principio activo para la formulación de la Suspensión.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA
OBTENCION DEL EXTRACTO TIROIDED



2. Pruebas de Identificación de las Hormonas I_2 y I_4 en el Extracto Tiroideo.

Las pruebas de identificación se hicieron comparándolas con un estándar.

a). A aproximadamente 50 mg. de muestra (Estándar), se colocaron en un plato de platino sobre una parrilla, y se dejó descomponer la muestra hasta que se liberaron vapores de yodo. Algo de este yodo se depositó en el plato dándole una apariencia "café rojizo". Esto implica la presencia de yodo. El mismo procedimiento se le realizó al extracto tiroideo, pero este al empezar a descomponerse desprendía olores desagradables, sin que se distinguieran los vapores de yodo, quedando el plato quemado al término de la prueba y con pequeños indicios de yodo que se pudieron ver en el plato, como en el caso del estándar. Esto se debe a que probablemente la cantidad de yodo en la muestra era poco y se eliminó por evaporación sin que se notara en forma de vapor, o las partes quemadas del plato impedían ver con facilidad el color "café rojizo" del yodo.

b). A aproximadamente de 50 mg. de muestra se le agrega 7.5 ml. de solución ácida de cloruro de sodio (preparada mezclando 30 ml. de agua, 25 ml. de alcohol, 10 ml. de hidróxido de sodio 1 N y 10 ml. de ácido clorhídrico concentrado) y 1 ml. de solución de nitrito de sodio (1 en 100).

Se deja reposar en la oscuridad por 20 minutos, y entonces se le adicionan 1.25 ml. de hidróxido de amonio, produciendo una coloración rosa. En la solución ácida de cloruro de sodio la muestra de estándar y de extracto no se disolvieron totalmente, después al agregarle el nitrito de sodio, ambas muestras toman una coloración amarilla tanto en en polvo como en la solución (más intensa en el caso del estándar), pero aún sin disolverse totalmente el polvo.

Después del reposo de 20 minutos en la oscuridad se les agregó el hidróxido de amonio, e inmediatamente la solución toma una coloración rosa (intensa para el estándar y tenue para el extracto). Por lo tanto esto implica que el extracto contiene T₄ y T₃.

c). La reacción de ninhidrina da color rosa que cambia a azul intenso cuando los α -aminoácidos están presentes en disolución neutra. En disolución ácida se desprende dióxido de carbono y puede dar una estimación cuantitativa de los aminoácidos libres. Un color azul intenso, que aparece rápidamente, indica la presencia de una amina primaria alifática o de un grupo aminoácido.

La presencia de un anillo aromático inhibe la respuesta, la inhibición aumenta al tener un grupo amino cerca del anillo. Si el grupo amino está asociado a un anillo saturado, se obtiene un

color rosa-violeta débil. El estándar y el extracto tiroideo no sufrieron reacción con ninhidrina.

d). Los grupos fenólicos presentes en las proteínas responden al Reactivo de Millon, una mezcla compleja de nitratos y nitritos mercurícos, ácido nítrico y óxidos de nitrógeno, que se forman al disolver mercurio en ácido nítrico concentrado y dilución del producto.

Los colores rojos los dan la tirosina, el ácido yodogorgico, la tiroxina y las proteínas que contienen unidades de estos aminoácidos. Con esta prueba se forman precipitados de color rojo, tanto con el estándar, como con el extracto.

3. Preparación de la Suspensión.

Las formulaciones se prepararon dispersando los polvos, previamente micronizados, en un vehículo apropiado.

Formulaciones de la Suspensión. Se proponen y elaboran 6 formulaciones para el tipo de Suspensión deseado.

Formulación 1:

Extracto tiroideo	0.64 g. (8%) Principio activo
Etilcelulosa	1.28 g. (1.03%) Viscosante
Glicerina	13.0 g. (13%) Humectante

Propilparabeno	0.05 g. (0.05%) Conservador
Metilparabeno	0.10 g. (0.1%) Conservador
Fosfato Diácido de Potasio	1.36 g. (1.36%) Regulador de pH
Agua destilada cbp.	100 ml.

Formulación 2:

Extracto tiroideo	0.64 g. (8%) Principio activo
Benzoato de Sodio	0.1 g. (0.1%) Conservador
Sorbitol	60.0 g. (60%) Edulcorante
Carboximetilcelulosa	1.08 g. (1.08%) Viscosante
Propilparabeno	0.05 g. (0.05%) Conservador
Metilparabeno	0.10 g. (0.1%) Conservador
Fosfato Diácido de Potasio	1.36 g. (1.36%) Regulador de pH
Agua destilada cbp.	100 ml.

Formulación 3:

Extracto tiroideo	0.64 g. (8%) Principio activo
Carboximetilcelulosa	1.03 g. (1.03%) Viscosante
Glicerina	13.0 g. (13%) Humectante
Propilparabeno	0.05 g. (0.05%) Conservador
Metilparabeno	0.10 g. (0.1%) Conservador
Fosfato Diácido de Potasio	1.36 g. (1.36%) Regulador de pH
Agua destilada cbp.	100 ml.

Formulación 4:

Extracto tiroideo	0.64 g. (8%) Principio activo
Carboximetilcelulosa	1.00 g. (1.03%) Viscosante

Jarabe	30.0 g. (13%) Correctivo
Propilenglicol	20.0 g. (20%) Humectante
Propilparabeno	0.05 g. (0.05%) Conservador
Metilparabeno	0.10 g. (0.1%) Conservador
Fosfato Diácido de Potasio	1.36 g. (1.36%) Regulador de pH
Agua destilada cbp.	100 ml.

Formulacion 5:

Extracto tiroideo	0.64 g. (8.2%) Principio activo
Veegum	1.50 g. (1.5%) Suspensor
Citrato Sódico	0.25 g. (0.25%) Peptizante
Jarabe	30.0 g. (13%) Correctivo
Propilparabeno	0.035 g. (0.035%) Conservador
Metilparabeno	0.065 g. (0.065%) Conservador
Fosfato Diácido de Potasio	1.36 g. (1.36%) Regulador de pH
Agua destilada cbp.	100 ml.

Formulacion 6:

Extracto tiroideo	0.64 g. (8.2%) Principio activo
Benzoato de Sodio	0.06 g. (0.06%) Conservador
Goma Tragacanto	0.6 g. (0.6%) Suspensor
Goma Arábica	0.6 g. (0.6%) Suspensor
Jarabe	25.0 g. (25%) Correctivo
Fosfato Diácido de Potasio	1.36 g. (1.36%) Regulador de pH
Agua destilada cbp.	100 ml.

En el siguiente cuadro se anotan las observaciones para cada formulación, y la viscosidad de cada una en centipoises.

Suspensión No.	Sedimento (ml)	Observaciones
1	26	150 cp
2	40	Con poco movimiento las partículas tienden a subir. No se observa claramente el límite entre las fases. 100 cp
Suspensión No.	Sedimento (ml)	Observaciones
3	59	42 cp
4	31	18 cp
5	50	Se comporta como la Suspensión No. 2 100 cp
6	15	150 cp

4. Pruebas de Efectividad Biológica de la Suspensión.

Se dispuso de 10 ratas macho, las cuales se distribuyeron en 3 lotes:

Testigos.- Ratas sin tratamiento.

Tratadas con Novotiral.- Se les administró 1 tableta diaria de Novotiral.

Tratadas con la Suspensión.- Se les administró 2 mililitros diarios de la Suspensión.

Cada lote se marcó y se dosificó de acuerdo a cada grupo. Se llevó un registro de peso y temperatura corporal por 10 días.

IV. OBSERVACIONES Y RESULTADOS

1. Apariencia del extracto.

El extracto es un polvo de color beige, con olor a carne, sabor a sal y suave al tacto.

2. Apariencia de la Suspensión.

Se elaboraron 6 suspensiones, de las cuales 2 se descartaron del proyecto por tener una apariencia poco estética, los volúmenes de sedimentación eran menores y era más difícil de

resuspender (se requería de una agitación vigorosa). Otras 2 suspensiones se utilizaron para hacer pruebas colorimétricas cuantitativas que no funcionaron como se esperaba. Y las últimas, se utilizaron para hacer las pruebas de efectividad biológica en ratas.

De las dos suspensiones que se usaron para la prueba de efectividad biológica, solo una suspensión fue del agrado de las ratas, es la formulación número 2. Estas dos formulaciones tenían un buen aspecto y sobre todo, se requería de agitarlas 2 veces para que se resuspendiera el sedimento.

La formulación que más les gustó a las ratas es una suspensión de color beige, turbia, con olor a extracto y sabor dulce. Debido a los componentes de la formulación y a las características propias del extracto, es muy fácil resuspender los componentes que se sedimentan. El porcentaje de sedimentación de esta suspensión es del 40 %, con una viscosidad de 100 cp.

3. Comportamiento de las ratas durante el proyecto.

En los primeros dos días, en general, el comportamiento de las ratas era el normal, es decir, la mayor parte del tiempo lo ocupaban en reposar, no se mostraban inquietas y mucho menos agresivas, por el contrario, estaban tranquilas.

En los siguientes días, la conducta de las ratas testigo era de tranquilidad, esta misma conducta siguió hasta el final del proyecto.

En cuanto a las ratas tratadas con Novotiral, del tercer día en adelante, se mostraban cada vez más inquietas, del sexto hasta el décimo día esta inquietud se observaba más o menos constante. En ningún momento se observaron agresivas.

Para las ratas tratadas con la Suspensión sucedió lo mismo, su inquietud aumentó y después se mantuvo estable, sin llegar a la agresividad. La inquietud que mostraban era un poco menos que las ratas tratadas con Novotiral.

Se observaba que las ratas tratadas (con Novotiral y con Suspensión) comían y bebían agua demasiado, en comparación con las ratas testigo.

T A B L A No. 1

REGISTRO DE VARIACION DE PESO CORPORAL DE RATAS TRATADAS.

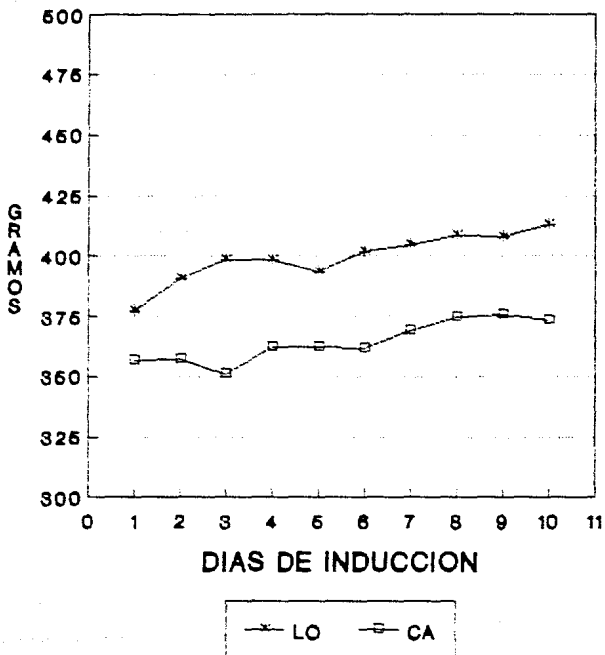
MARCADO	DIAS DE INDUCCION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA	LO	377.5	398.5	398.5	398.5	393.5	482.8	485.8	488.5	488.8	413.8
	CA	356.5	357.8	351.8	362.5	362.5	361.5	369.8	374.5	375.5	373.5
MUSEO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA	CO	487.8	418.5	483.8	487.8	481.8	483.5	482.8	488.5	399.5	484.8
	PD	379.5	373.8	379.8	383.5	369.5	378.5	367.5	366.8	368.8	368.8
	PI	434.5	435.5	425.8	429.5	418.5	422.8	417.8	428.8	413.8	421.8
	PD	361.5	359.8	358.8	354.5	353.5	356.5	353.5	353.8	351.5	351.8
CENTRO DE INVESTIGACION Y DESENO	RI	463.5	462.8	461.8	456.8	451.5	453.5	457.5	453.5	452.5	451.5
	CALO	415.5	482.8	411.8	418.5	489.8	416.5	415.8	414.5	413.8	412.8
	LOCO	357.5	357.8	365.8	366.8	361.5	371.5	367.8	369.8	367.8	365.5
	CMB	395.8	399.5	398.8	488.5	399.8	399.8	488.8	481.8	481.8	481.5

SE MUESTRAN EN LA PRIMER COLUMNA LAS SIGLAS COMO SE MARCARON LAS RATAS, INDICANDOSE A QUE LOTE CORRESPONDE CADA UNA.

LAS SIGUIENTES COLUMNAS SE REFLEJAN AL PESO EN GRAMOS DE CADA RATA POR DIA.

FIGURA 1,1

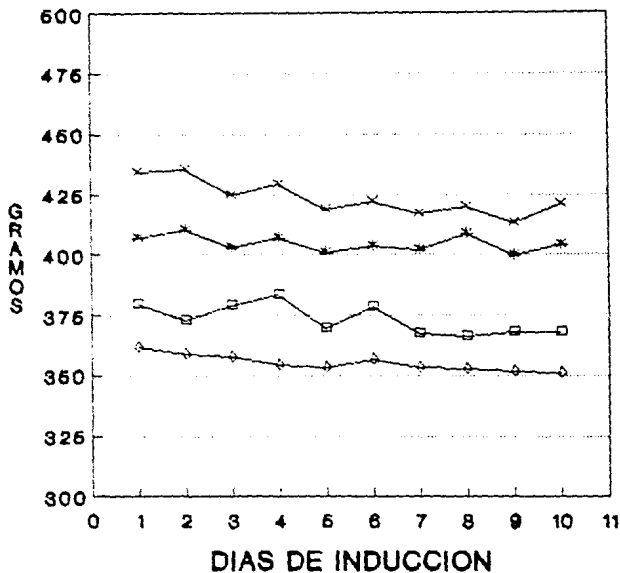
GRAFICA DE PESO RATAS TESTIGOS



SE MUESTRA LA VARIACION DE PESO EN RATAS SIN TRATAMIENTO

FIGURA 1,2

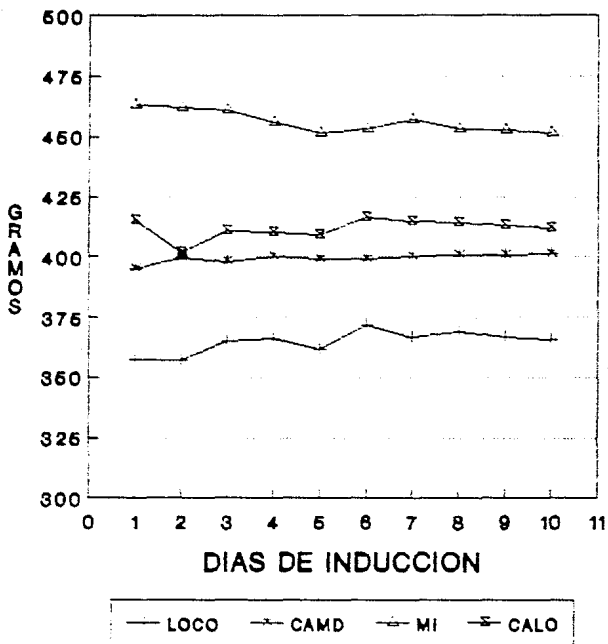
GRAFICA DE PESO RATAS TRATADAS CON NOVOTIRAL



SE MUESTRA LA VARIACION DE PESO DE RATAS TRATADAS CON
1 TABLETA/DIA DE NOVOTIRAL

FIGURA 1,3

GRAFICA DE PESO RATAS TRATADAS CON SUSPENSION



SE MUESTRA LA VARIACION DE PESO DE RATAS TRATADAS CON
2 ML/DIA DE SUSPENSION

T A B L A No. 2

REGISTRO DE VARIACION PROMEDIO DE PESO CORPORAL DE RATAS TRATADAS.

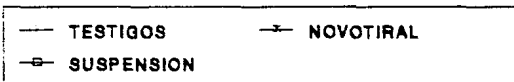
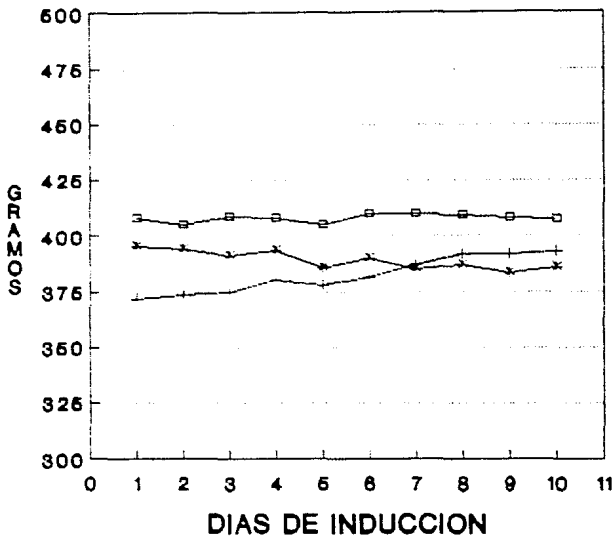
LOTES	DIAS DE INDUCCION									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
INDUCCION	367.8	373.75	374.75	388.5	378.8	381.75	387.8	391.5	391.75	393.25
EDC. UNIFORME	395.63	394.5	391.25	393.63	385.63	398.13	385.8	386.88	383.8	386.8
EDC. UNIFORME	487.88	485.13	486.75	488.25	485.25	418.13	489.88	489.5	488.38	487.63

SE MUESTRAN EN LA PRIMER COLUMNA LOS LOTES DE RATAS.

LAS SIGUIENTES COLUMNAS SE REFIEREN AL PESO PROMEDIO EN GRAMOS, DEL LOTTE, POR DIA.

FIGURA 2,1

GRAFICA DE PESO PROMEDIO DE PESO CORPORAL



SE MUESTRA LA VARIACION DE PESO PROMEDIO DE RATAS
CON Y SIN TRATAMIENTO

T A B L A No. 3

REGISTRO DE VARIACION DE TEMPERATURA CORPORAL DE RATAS TRATADAS.

DIAS DE INDUCCION

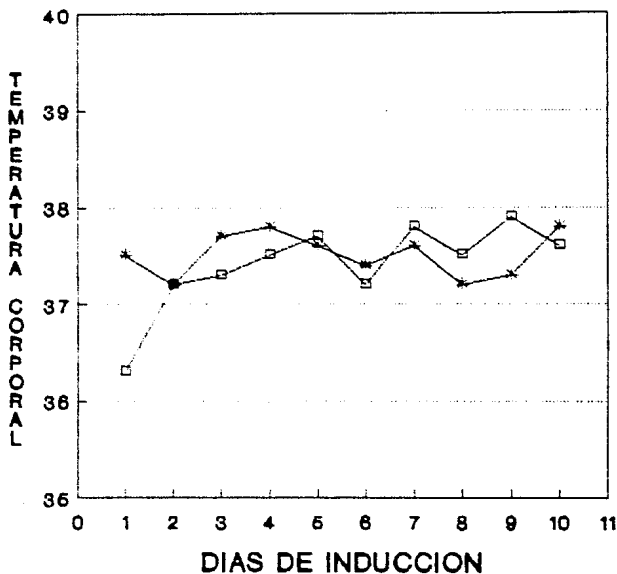
MARCADO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LO	37.5	37.2	37.7	37.8	37.6	37.4	37.6	37.2	37.3	37.8
CA	36.3	37.2	37.3	37.5	37.7	37.2	37.8	37.5	37.9	37.6
CO	37.5	37.6	38.8	38.7	38.4	37.6	38.1	39.8	38.5	38.3
PD	37.2	37.1	39.2	38.9	38.5	37.8	38.6	39.1	38.8	38.6
PI	37.2	37.7	38.8	38.7	38.8	38.2	38.1	38.3	38.2	38.7
PD	36.1	37.5	38.2	39.1	38.9	38.7	38.4	38.9	38.2	38.2
PI	36.8	36.8	38.6	38.1	38.3	37.8	38.2	38.3	38.2	38.4
CALO	36.3	37.6	37.7	38.2	38.3	37.9	38.8	38.4	38.4	38.2
LOCO	37.2	37.8	38.4	38.6	38.5	38.4	38.5	38.6	38.3	38.2
CAMO	36.7	37.6	38.3	37.9	37.9	38.2	38.3	38.4	38.1	38.3

MUESTRA EN LA PRIMERA COLUMNA LAS SIGLAS COMO SE MARCARON LAS RATAS, INDICANDOSE A QUE LOTE CORRESPONDE CADA UNA.

LAS SIGUIENTES COLUMNAS SE REFIEREN AL PESO EN GRAMOS DE CADA RATA POR DIA.

FIGURA 3,1

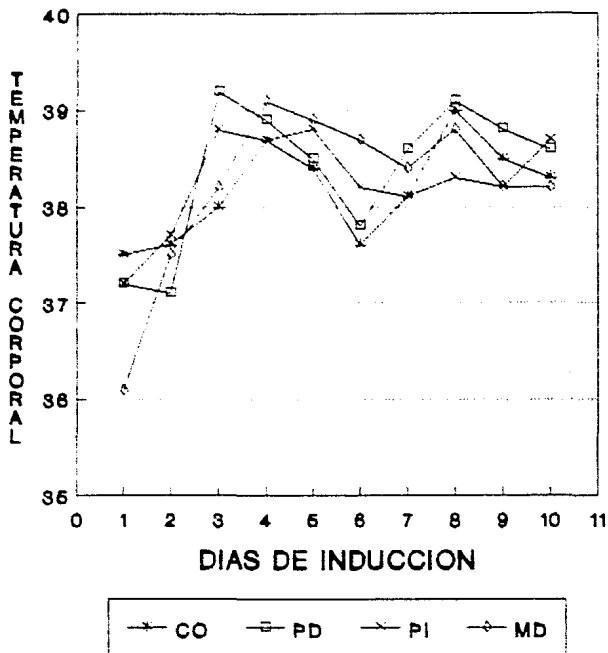
GRAFICA DE TEMPERATURA RATAS TESTIGOS



SE MUESTRA LA VARIACION DE TEMPERATURA DE RATAS SIN
TRATAMIENTO

FIGURA 3,2

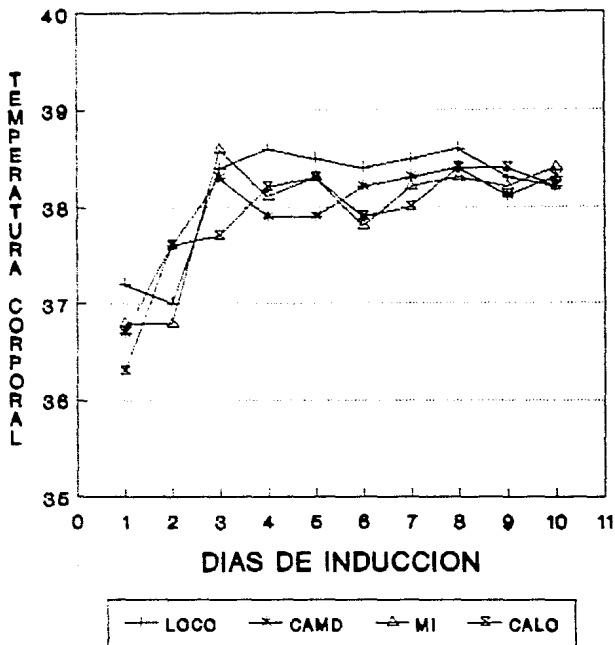
GRAFICA DE TEMPERATURA RATAS TRATADAS CON NOVOTIRAL



SE MUESTRA LA VARIACION DE TEMPERATURA DE RATAS TRATADAS CON
1 TABLETA/DIA DE NOVOTIRAL

FIGURA 3,3

GRAFICA DE TEMPERATURA RATAS TRATADAS CON SUSPENSION



SE MUESTRA LA VARIACION DE TEMPERATURA DE RATAS TRATADAS CON
2 ML/DIA DE SUSPENSION

T A B L A No. 4

REGISTRO DE VARIACION PROMEDIO DE TEMPERATURA CORPORAL DE RATAS TRATADAS.

LOTES	DIAS DE INDUCCION									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	36.9	37.2	37.5	37.65	37.65	37.3	37.7	37.35	37.6	37.7
2	37.8	37.48	38.55	38.85	38.65	38.85	38.3	38.8	38.43	38.45
3	36.75	37.25	38.25	38.2	38.25	38.88	38.25	38.4	38.25	38.3

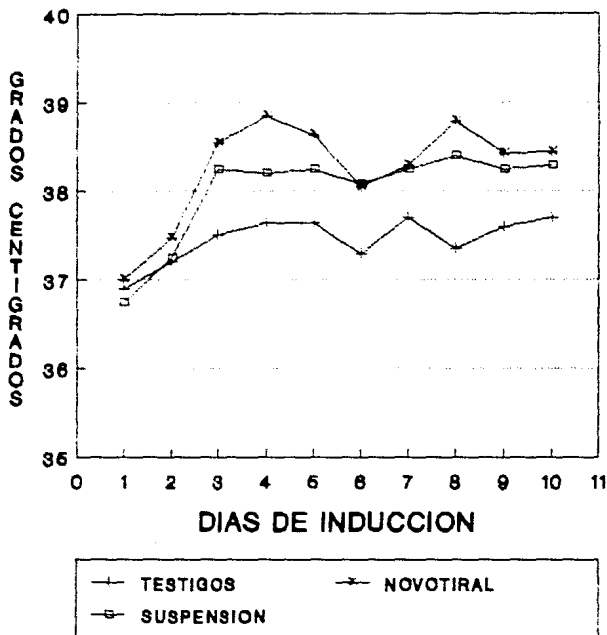
SE MUESTRAN EN LA PRIMER COLUMNA LOS LOTES DE RATAS.

LAS SIGUIENTES COLUMNAS SE REFIEREN A LA TEMPERATURA PROMEDIO EN GRADOS CENTIGRADOS, DEL LOTE, POR DIA.

FIGURA 4,1

GRAFICA DE TEMPERATURA

PROMEDIO DE TEMPERATURA CORPORAL



SE MUESTRA LA VARIACION DE TEMPERATURA PROMEDIO DE RATAS
CON Y SIN TRATAMIENTO

4. a). ANALISIS DE VARIANZA

El análisis de varianza puede definirse como una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se distribuye en varias componentes.

Con cada una de estas componentes está asociada una fuente específica de variación, de modo que en el análisis es posible averiguar la magnitud de las contribuciones de cada una de estas fuentes a la variación total.

El siguiente análisis se hizo basado en los datos de temperatura, debido a que los cambios de temperatura son más confiables para este análisis, ya que si se observan los datos de peso, el resultado del análisis sería, para todos los casos, que hay diferencias significativas.

Modelo: El modelo consiste de una representación simbólica de un valor típico tomado de los datos que se están analizando.

El modelo para este análisis de varianza es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \epsilon_{ij}$$

EL primer análisis se hizo comparando las diferencias entre los datos de los tratamientos.

T R A T A M I E N T O

LOTE TRATADO CON NDVOTIRAL		LOTE TRATADO CON SUSPENSION	
37.00		36.75	
37.48		37.25	
38.55		38.25	
38.85		38.20	
38.65		38.25	
38.05		38.08	
38.30		38.25	
38.80		38.40	
38.43		38.25	
38.45		38.30	
TOTAL	382.56	379.98	
MEDIA	$\bar{x} = 38.256$	$\bar{x} = 37.998$	

Hipótesis: Se prueba la hipótesis nula de que todas las medias de tratamiento son iguales contra la alternativa de que los miembros no son iguales. Formalmente se enuncian las hipótesis como sigue:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ (No hay diferencia entre los tratamientos)

$H_A: \mu_1 \neq \mu_2$ (Hay diferencia entre los tratamientos)

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Para hacer los cálculos se usan los símbolos que se definen como sigue:

x_{ij} = la j -ésima observación que recibe el i -ésimo tratamiento,

$$i = 1, 2, \dots, k$$

$$j = 1, 2, \dots, n_i$$

$$T_{.j} = \sum_{i=1}^k x_{ij} = \text{total de la } j\text{-ésima columna}$$

$$\bar{x}_{.j} = T_{.j} / n_j = \text{media de la } j\text{-ésima columna}$$

$$T_{..} = \sum_{j=1}^k T_{.j} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^k x_{ij} = \text{total de todas las observaciones}$$

$$\bar{T}_{..} = T_{..} / N,$$

$$N = \sum_{j=1}^k n_j$$

Ecuaciones para el cálculo de la suma de cuadrados de los tratamientos, suma de cuadrados del error, los grados de libertad y la "F" calculada, en donde:

t = se refiere al tratamiento, e = error, gl = grados de libertad, SC = suma de cuadrados, MC = media cuadrada, "F" = F calculada, K = número de tratamientos y N = número total de datos.

$$SC_t = \sum_{j=1}^k T_{.j}^2 / n_j - T_{..}^2 / N$$

$$SC_e = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}^2$$

$$gl_t = K - 1$$

$$gl_e = N - K$$

$$MC_t = SC_t / gl_t$$

$$MC_e = SC_e / gl_e$$

$$"F" = MC_t / MC_e$$

Para este primer análisis la tabla de ANADEVIA queda de la siguiente forma:

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRADA	" F " CALCULADA
TRATA - MIENTO	0.33282	1	0.33282	1.023
ERROR	5.8538	18	0.32521	- o -

Se rechaza H_0 si $F_{calc} > F_{tablas}$

F calculada = 1.023

F de tablas ($\alpha = 0.05$) (1,18) = 4.41

Como $F_{calc} < F_{tablas}$. . . NO SE RECHAZA H_0 .

NO HAY DIFERENCIA ENTRE LOS TRATAMIENTOS.

El siguiente análisis se hizo comparando las diferencias entre los datos promedio de los tratamientos y los datos promedio de los testigos, siguiendo el mismo procedimiento que el análisis anterior.

El modelo para este análisis de variancia es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

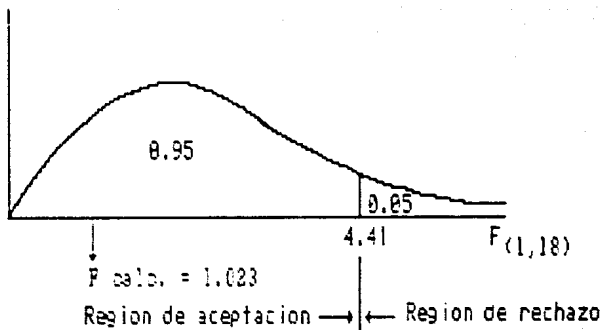


FIGURA 4.a.1. SE MUESTRAN LAS REGIONES DE ACEPTACION Y RECHAZO RESULTANTES.

TRATAMIENTO		
LOTE TRATADO CON NOVOTIRAL	LOTE TRATADO CON SUSPENSION	LOTE TESTIGO
37.00	36.75	36.90
37.48	37.25	37.20
38.55	38.25	37.50
38.85	38.20	37.65
38.65	38.25	37.65
38.05	38.08	37.30
38.30	38.25	37.70
38.80	38.40	37.35
38.43	38.25	37.60
38.45	38.30	37.70
TOTAL 382.56	379.98	374.55
MEDIA $\bar{x} = 38.256$	$\bar{x} = 37.998$	$\bar{x} = 37.455$

Hipotesis:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ (No hay diferencia entre los tratamientos)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ (Hay diferencia entre los tratamientos)

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Para este segundo análisis la tabla de ANADVA queda de la siguiente forma:

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA CUADRADA	" F " CALCULADA
TRATA - MIENTO	3.34338	2	1.67169	6.965
ERROR	6.48105	27	0.24	- 0 -

Se rechaza H_0 si $F_{calc} > F_{tablas}$

F calculada = 6.965

F de tablas ($\alpha = 0.05$) (2,27) = 3.34

Como $F_{calc} > F_{tablas}$. . . SE RECHAZA H_0 .

HAY DIFERENCIA ENTRE LOS TRATAMIENTOS.

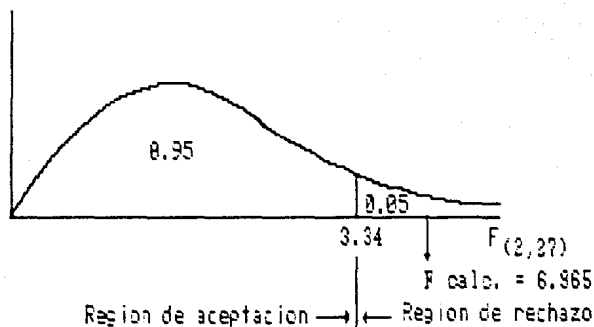


FIGURA 4.a.2. SE MUESTRAN LAS REGIONES DE ACEPTACION Y RECHAZO RESULTANTES.

V. DISCUSION

En consideración a los objetivos planteados, es conveniente indicar que la adquisición de las glándulas tiroideas (materia prima) es relativamente fácil. Sin descartar el hecho de acudir a los lugares en que se sacrifican bovinos (para consumo humano), para adquirirlas frescas e inmediatamente después de su muerte, trasladándolas en recipientes adecuados en congelación.

La obtención del extracto crudo de la glándula, siguiendo las indicaciones del capítulo de metodología, es un procedimiento sencillo. Las pruebas de identificación de las hormonas tiroideas en el extracto, evidenciaron la presencia de las mismas. Haciendo hincapié que resultaron positivas las pruebas de:

- 1.- Descomposición al calor.
- 2.- Reacción colorida con nitrito de sodio e hidróxido de amonio.
- 3.- Reacción del Reactivo de Millon

Con ello se estableció que el extracto poseía las hormonas tiroideas (T_3 y T_4).

La presentación farmacéutica elegida para este extracto es: Suspensión. Fue seleccionada en base a las características propias del extracto, tales como: es un polvo fino; insoluble en agua; es higroscópico.

Además de que en el mercado existen preparaciones cuyo principio activo son hormonas tiroideas o extractos, de presentación farmacéutica: comprimidos y capsulas. Por lo que la presentación propuesta no tiene competencia en el mercado.

De 79.4 g. de glandula fresca se obtuvo 49.65 g. de extracto tiroideo; del cual se utilizaron 640 mg. para preparar 100 ml. de suspensión. Por lo que es posible preparar 7757.85 ml de ella, teniendo un rendimiento de 3978.93 dosis de 2 ml. cada una.

De las 6 formulaciones propuestas, la No. 2 ha sido considerada la mejor, esto es en virtud de su apariencia, el gusto de las ratas por esta formulación, su estabilidad (de su preparación al empleo, para probar su efectividad biológica, transcurrieron 7 meses, después de los cuales se apreciaron las manifestaciones características de las hormonas tiroideas). A este respecto, podemos indicar que al comparar los efectos de un fármaco que se expende comercialmente (NOVOTIRAL) con la suspensión, se aprecia que:

a. Los efectos observados en cuanto a variación de peso en ratas dosificadas (2 ml. de suspensión por día durante 10 días), se aprecia una ligera variación del peso al compararlas con ratas testigo. En ratas dosificadas con Novotiral, la variación de peso se comporta de manera similar. Sin embargo, las ratas testigo muestran una tendencia a aumentar de peso.

Se puede argumentar que ambos lotes dosificados con hormonas tiroideas (Novotiral y Suspensión), mostraban gran inquietud, señalándose que estos efectos son característicos de las hormonas (no aumentar de peso e inquietud) Fig. 3,1; Tabla 3.

Se esperaba una disminución de peso, pero consumían gran cantidad de alimento, por lo que el que no aumentaran de peso es un parámetro válido.

b. Los efectos observados en cuanto a variación de temperatura en ratas dosificadas (2 ml. de suspensión por día durante 10 días), se aprecia un incremento promedio de 0.7°C en la temperatura corporal con respecto a las testigo y a 10 días de dosificación.

Los lotes dosificados con hormonas tiroideas (Novotiral y Suspensión), entre si muestran una diferencia promedio de 0.15°C de variación, por lo que se argumenta que el novotiral a 10 días incrementó la temperatura corporal a 38.45°C y la suspensión elaborada en la FES-C 38.3°C . Ambos fármacos provocan el incremento de temperatura, tal cual se esperaba por los efectos de la hormona (Fig. 4.1; Tabla No. 4).

Se esperaba (de existir hormonas en la suspensión) un incremento de temperatura corporal en las ratas utilizadas para las pruebas biológicas del fármaco.

Finalmente, se hizo un Analisis de Varianza en el cual podemos establecer que el extracto y la suspensión elaborada, poseen las hormonas tiroideas y que además funcionan.

No se usaron los datos de peso debido a que las diferencias en el peso de los lotes de ratas eran muy grandes, y por lo tanto, el análisis de varianza siempre concluía diferencias significativas, para todos los casos.

El primer análisis se hizo comparando las diferencias entre los datos promedio de temperaturas de los tratamientos.

El resultado de este análisis, realizando una prueba de " F ", da como resultado, que NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS entre los tratamientos. Por lo tanto, se puede decir que los dos tratamientos funcionan de igual forma.

El siguiente análisis se hizo comparando las diferencias entre los datos promedio de temperaturas de los tratamientos y los datos promedio de los testigos.

El resultado de este análisis, realizando una prueba de " F ", al igual que el anterior, da como resultado, que SI HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS entre las ratas tratadas y las ratas testigo. Por lo tanto, se puede decir que los dos tratamientos funcionaron como se esperaba, ya que las ratas testigo no aumentaron su temperatura.

Existe la posibilidad de continuar la línea de investigación con un proyecto en el que se ubique la purificación de T₂ y T₄ a partir del extracto obtenido.

También es posible calcular el tiempo de caducidad real por medio de un diseño experimental adecuado.

VI. CONCLUSIONES

Se obtuvo el extracto crudo de tiroides de bovino, diseñándose y elaborándose con él una suspensión de bajo costo y de fácil administración por vía oral en animales de laboratorio, por lo que es accesible al laboratorio de Bioquímica de Sistemas y otros que lo requieran.

Para las ratas, la formulación No. 2 fue de mayor agrado que la formulación No. 1, ya que con la formulación No. 2 no se tuvieron problemas para la administración oral.

De las 6 formulaciones propuestas, la suspensión No. 1 y la suspensión No. 2 fueron las mejores en virtud de su apariencia, viscosidad, sabor, estabilidad y manipulación.

Las dos suspensiones se mantuvieron en reposo por 7 meses en un lugar oscuro, y aún después de este tiempo el principio activo de ambas suspensiones se encontraba en una concentración tal que cuando fue administrado, se manifestaron los signos clásicos de las hormonas tiroideas, esto indica que la estabilidad de las hormonas tiroideas en las formulaciones es aceptable.

El Análisis de Varianza indica que no hay diferencias significativas entre las ratas que recibieron ambos tratamientos (Novotiral y Suspensión), y también indica que hay diferencias

significativas entre las ratas que recibieron ambos tratamientos y las ratas que no recibieron tratamiento (ratas Testigos).

El costo que tiene la preparacion de la Suspension comparado con el costo que tienen las tabletas de Novotiral es mucho menor, debido al alto rendimiento que tiene el extracto en la Suspension.

VII. REFERENCIAS

- 1.- Bhagavan, N. V.; Bioquímica; 2ª edición; Interamericana; México 1984; pp. 543, 545.
- 2.- British Pharmacopoeia; Volume I & II; UK; 1988; p. 572, Apendix II-B.
- 3.- Clarke; Isolation and Identification of Drugs; 2ª edición; The Pharm. Press; London 1986; pp. 142, 1023.
- 4.- Delgado Buenrostro, Norma L.; Determinación de Algunos Parámetros Físicos y Bioquímicos en Ratas Tiroidectomizadas Parcialmente y Efectos Provocados Sobre Estas al Administrar Hormonas Tiroideas; Tesis de Licenciatura de OFB. FES-C; UNAM 1989; pp. 38-39.
- 5.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos; 4ª edición; Secretaría de Salubridad y Asistencia; México 1974; pp. 19, 21, 26, 91, 97, 1147-1149.
- 6.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos; 5ª edición; Secretaría de Salubridad y Asistencia; México 1988; pp. 132-134, 263, 259, 292-293, 893-896, 1469-1467.
- 7.- Ganong, William F.; Fisiología Médica; 9ª edición; El Manual Moderno México 1984; pp. 261-262, 264, 266.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

8.- Guyton, Arthur C.; Tratado de Fisiología Médica; 5ª edición; Interamericana; México 1984; pp. 1101-1112.

9.- Helman, José; Farmacotecnia teórica y práctica; CECOSA; México 1982; pp. 501-510, 1847-1854, 1941, 2233.

10.- Hideniko Nakagawa and Sachya Ohtaki; Thyroxine (T₄) Release From Thyroglobulin and It's T₄-Containing Peptide by Thyroid Thiol Proteases; The Endocrine Society; 116(4), 1433-1439; (1985).

11.- Jacob, Stanley W. et. al.; Anatomía y Fisiología Humana; 4ª edición; Interamericana; México 1982; pp. 93, 552-556.

12.- Kaplan, Lawrence A. et. al.; Química Clínica; Médica Panamericana; Buenos Aires 1986; pp. 886, 895, 896, 902.

13.- Lehninger, Albert L.; Bioquímica; Ediciones Omega; España 1988; p. 27.

14.- Martínez Sobrevilla, Ricardo; Procedimientos Adecuados de Fabricación de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales; Tesis de Licenciatura de DFB. FES-C; UNAM 1985; pp. 7-13, 39-40.

15.- Merck; El Manual Merck; 7ª edición; Interamericana; México 1986; pp. 920-935.

- 16.- Murray, Robert K., et. al.; Bioquímica de Harper; 11ª edición; El Manual Moderno; México 1988; pp. 498-499.
- 17.- Parrot, Eugene L.; Pharmaceutical Technology, Fundamental Pharmaceutics; Burges Publishing Company; Minneapolis, Minn.; USA, 1971; pp. 75, 77-79.
- 18.- Potter, D. D.; Rose, M. B.; Estudio Clínico Integral; 1ª edición; Interamericana; México 1985; pp. 213, 214.
- 19.- Remington's Pharmaceutical Sciences; 17ª edition; Mack Publishing Co.; USA 1985; p. 1492.
- 20.- Sisson y Grossman; Anatomía de los Animales Domésticos; 5ª edición; Salvat Editores; México 1982; pp. 1060-1061.
- 21.- Smith, Oliver L.; Química Orgánica; Reverté; México 1970; pp. 763-764.
- 22.- Streitwieser, A.; Química Orgánica; Interamericana S.A.; México 1983; pp. 814-830.
- 23.- Wallis, T. E.; Manual de Farmacognosia; 1ª edición; C.E.C.S.A.; México 1966; pp. 575-576.
- 24.- White, Abraham, et al.; Principios de Bioquímica; McGraw-Hill; México 1970; pp. 922-928.

25.- Windle, William F.; Histología; 5ª edición; McGraw-Hill; México 1977; pp. 511-513.

26.- Litter, Manuel; Compendio de Farmacología; 3ª edición; El Ateneo; Buenos Aires 1984; pp. 423, 424, 427.

27.- Rebollar Barrera, María Guadalupe; Cristalización Esférica de Sulfatiazol y sus Efectos Sobre la Velocidad de Sedimentación en Suspensión; Tesis de Licenciatura de QFB. FES-C; UNAM 1988; p. 3.

28.- Las Ciencias Farmacéuticas de Remington; Remington; FARMACIA; 17ª edición; Médica Panamericana; Buenos Aires 1987; pp. 423-445, 1336-1341, 2021-2023.

29.- Miranda C., Guillermina; Curso de Actualización Sobre Tecnología Farmacéutica; Asociación Farmacéutica Politécnica, E.N.C.B., I.P.N.; México 1984; pp. 20-22.

30.- Idson, Bernard J; Sheco, Alma J.; Curso de Actualización Sobre Tecnología Farmacéutica; Asociación Farmacéutica Politécnica, E.N.C.B., I.P.N.; México 1984; pp. VIII-3 - VIII-12.

31.- Doorn, J Van; Roelfsema, F.; and Heide, D. Van Der; Concentrations of Thyroxine and 3,5,3'-Triiodothyronine at 34 Different Sites in Euthyroid Rats as Determined by an Isotopic Equilibrium Technique; The Endocrine Society; 177(3), 1201-1208; (1985).

32.- Doorn, J Van; Roelfsema, F.; and Heide, D. Van Der; Contribution From Local Conversion of Thyroxine to 3,5,3'-Triiodothyronine to Intracellular 3,5,3'-Triiodothyronine in Several Organs in Hypothyroid Rats at Isotope Equilibrium; Acta Endocrinologica; 101:386-396; (1982).

33.- Neuhaus, Orten; Bioquímica Humana; 10ª edición; Médica Panamericana; Argentina 1984; pp. 631-636.

34.- Martindale; The Extra Pharmacopoeia; Twenty-sixth edition; Norman W. Blacow, The Pharmaceutical Press; London 1975; pp. 1783-1790.

35.- Berkow, Robert; El Manual Merck de Diagnostico y Terapéutica; 7ª edición; Interamericana; Mexico 1986; pp. 920-935.

36.- Florey, Klaus; Analytical Profiles of Drug Substances; Volume 5; Academic Press INC.; London 1988; pp. 225-281.

37.- Erlenbrack, David E.; Rosenberg, Lawson L.; Binding of Thyroid Hormones to Nuclear Extracts of Thyroid Cells; The Endocrine Society; 119(1), 311-7; (1988).

38.- Boyer, P. J.; Jones, M. J.; Nachreiner, R. F.; et. al.; Caprine Beta-mannosidosis. Abnormal Thyroid Structure and Function in a lysosomal storage disease.; Lab. Invest.; 63(1), 100-6; (1990).

39.- Rosset, B.; Selmi, S.; Borner, H.; et. al.; Thyroid Hormone Residues are Released From Thyroglobulin With Only Limited Alteration of The Thyroglobulin Structure.; J. Biol. Chem.; 264(21), 12620-6; (1989).

40.- Chae, K.; McKinney, J. D.; Molecular Complexes of Thyroid Hormone Thyrosyl rings With Aromatic Donors. Possible Relationship to Receptor Protein Interactions.; J. Med. Chem.; 31(2), 357-62; (1988).

41.- Titanoja, S. H.; Touhti, A.; Liewendahl, B. K.; Association Between Increased Concentrations of Free Thyroxine and Unsaturated Free Fatty Acids in Non-Thyroidal Illnesses: Role of Albumin.; Clinica Chim. Acta; 179(1), 33-43; (1989).

- 42.- Muller, M. J.; Acheson, K. J.; et. al.; Effect of Thyroid Hormones on Oxidative and Nonoxidative Glucose Metabolism in Humans.; American Journal of Physiology; 255(2); 1, E146-E152; (1988).
- 43.- Moody, J. E.; Hohmann, J. R.; Kaplan, G. B.; Autoantibodies to Thyroxine and Triiodothyronine. Clin. Chem; 34(5), 944-6; (1988).
- 44.- Miyamoto, T.; Hashizume, K.; et. al.; The Effects of Dietary Iodine on Thyroid Ultrastructure.; Tissue Cell; 20(1), 79-88; (1988).
- 45.- Ikeda, H.; et. al.; Thyrotropin Regulation of Thyroid Cell Functions: Mechanisms and Relationship to Thyroid Disease.; Ann. Ist. Super. Sanita; 24(1), 117-27; (1988).
- 46.- Sugawara, M.; Lau, R.; Wasser, H. L.; et. al.; Effect of Thyroxine Replacement Therapy on the Growth Patterns of Body, Brain and Cerebellum in the Neonatal Hypothyroid Rat.; Exp. Neurol; 10(1), 1-16; (1988).
- 47.- Erkenbrack, D. E.; Rosenberg, L. L.; Clinical and Experimental Studies on the Potentiation of Antidepressant Drugs by Thyroid Hormones.; Med. Sci. Res; 16(11), 545-50; (1988).

48.- Bitman, J.; Tao, H.; The Hypothyroid (hyt/hyt) Mouse: A Model System For Studing the Effects of Thyroid Hormone on Developmental Changes in Gene Expression.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA.; 85(15), 5592-6; (1988).

49.- Daniel, Wayne W.; Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud; 1ª edición; Limusa; México 1982; pp. 193-220.

50.- Cortez, A. R.; Dominguez, A.; Diseño y Análisis Estadístico en Bioequivalencia; Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 21(6), 27-30; (1991).

51.- Parlar, M.; Yortsos, Y. C.; Nucleation and Pore Geometry Effects in Porous Media.; J. Colloid Interface Sci.; 132(2), 425-43; (1989).

52.- Campbell, G. A.; Gorgacs, G.; Viscosity of Concentrated Suspensions: An Approach Based on Percolation Theory.; Phys. Rev. A; 41(8), 4570-3; (1990).

53.- Given, James A.; Stell, George.; Scaled-particle Theory And The Short Distance Behavior of Continuum Percolation.; J. Chem. Phys.; 92(7), 4433-46; (1990).